

# **C5-citozin metiltranszferázok szekvenciaspecifikus DNS felismerésének vizsgálata**

A Ph.D. értekezés tézisei

Raskó Tamás

Témavezető: Dr Kiss Antal

MTA SzBK Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

2003

## Bevezetés

A dolgozat két önálló témát mutat be. Az első rész hat prokarióta C5-citozin metiltranszferáz által kiváltott DNS görbítéssel foglalkozik, míg a második részben a *Spiroplasma species*-ből izolálható SssI metiltranszferáz egy meghatározott biotechnológiai célra előállított variánsaival kapcsolatos eredményeket foglalom össze.

Az élőlények DNS-ében a négy ismert bázison kívül találhatunk módosított bázisokat, amelyek az adenin vagy a citozin metilált származékai. A metilációt a DNS-metiltranszferázok végzik, melyek többsége szekvenciaspecifikus enzim, azaz a DNS-t csak bizonyos, az enzimre jellemző nukleotidsorrendnél metilálják. A metiláció végeredménye N6-metiladenin, N4-metilcitozin és C5-metilcitozin lehet. A reakcióban felhasznált metildonor az S-adenozil-L-metionin (SAM). A DNS-metiláció nincs hatással a Watson-Crick bázispárosodás kialakulására. A metilcsoport mindhárom metilált bázis esetében a DNS nagy árkában helyezkedik el, így a DNS-kötő fehérjék számára könnyen felismerhető. Mivel a C5-citozin metilázok (C5-MTáz) rövid DNS szekvenciát ismernek fel és viszonylag kis mérettel rendelkeznek, ezért kitűnő alanyaivá váltak a szekvenciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatás kutatásnak. A szerkezeti és működésbeli hasonlóság miatt a prokarióta C5-metiltranszferázok vizsgálata során nyert információk talán elősegíthetik a humán metiltranszferáz működésének megértését is.

## A dolgozat előzményei, célkitűzések

Számos, a DNS-t szekvenciaspecifikusan felismerő fehérje érdekes vonása, hogy a felismerőszekvencia környezetében, vagy azon belül meghajlítja a DNS-t. Ez a folyamat többnyire a DNS felismerés folyamatát segíti elő, de

némely esetben a görbítés, a kialakult fehérje-DNS komplex szerkezet stabilizálásához is hozzájárul. A *Bsp*RI metiltranszferáz footprint analízise során az a hipotézis merült fel, hogy az enzim a felismerőhelyéhez való kötődésekor valószínűleg görbületet hoz létre. Cirkuláris permutációs gélretardációval végzett vizsgálataink valóban azt mutatták, hogy a *Bsp*RI MTáz a specifikus enzim-DNS komplexben meggörbíti a DNS-t. Mivel ez az eredmény ellentmondani látszott a irodalomban közölt, más módszerekkel kapott eredményeknek, a vizsgálatokba más C5-citozin metiltranszferázokat is bevontunk.

2001-ben csoportunk egy nemzetközi konzorcium tagjaként elnyerte az EU 5. kutatási keretprogramjának támogatását tetszőlegesen módosítható, "programozható" specifitású C5-citozin metiltranszferáz előállítására. Az elképzelésünk szerint, ha egy C5-MTáz kovalensen hozzákapcsolunk egy oligonukleotidhoz (ODN), vagy egy peptid nukleinsavhoz (PNA), akkor az enzim specifitását részben az fogja meghatározni, hogy a PNA, illetve az ODN affinitásfarok a genom mely szekvenciájához fog kötődni. A cél, hogy az ODN-nel, illetve a PNA-val konjugáltatott *Sss*I metiltranszferáz variánsok alkalmasak legyenek arra, hogy szövettenyészetekbe juttatva egy adott gén promóterét *in vivo* szelektíven metilálják és ezáltal a gén transzkripcióját megszüntessék. A különböző szekvenciájú ODN és PNA karok a metiltranszferázt így programozható specifitásúvá alakítanák át. Csoportunk feladata a konzorciumban, hogy az *Sss*I MTáz szerkezetét úgy módosítsa, hogy alkalmas legyen ODN-nel vagy PNA-val történő konjugációra. A dolgozat második része ezen munka során kapott eredményeinket mutatja be.

## **Alkalmazott módszerek**

- DNS plazmid tisztítás
- DNS fragmentumok agaróz és poliakrilamid gélelektroforézise
- fehérjék SDS-poliakrilamid gélelektroforézise
- DNS tisztítás agaróz és poliakrilamid-gélből
- Plazmid DNS bejuttatása *Escherichia coli* sejtekbe
- Foszforilált és foszforilálatlan linker-beépítés
- PCR reakciók és a T/A klónozás
- Helyspecifikus mutagenézis
- A fúziós *SssI* metiltranszferázok túltermelése és tisztítása affinitás és heparinagaróz oszlopokon
- Sejtextraktum készítése
- Metiltranszferáz aktivitás mérése [ $^3\text{H}$ -metil] csoport beépülése alapján

## **Tudományos eredmények és következtetések**

### *C5-citozin metiltranszferázok által kiváltott DNS görbítés vizsgálata*

1, A DNS görbítés kimutatása céljából négy plazmidot készítettünk (pBend-GGCC, pBend-GGWCC, pBend-GCGC, pBend-CCGG), amelyek polilinker szekvenciái alkalmasak a gélretardációhoz szükséges cirkulárisan permutált DNS fragmentumok létrehozására.

2, Hat C5-citozin metiltranszferázzal végeztünk gélretardációs kísérleteket, amelyek eredményeiből a következő megállapítást tettük: A *Bsp*RI (az enzim specifitása GGCC, a metilált citozin aláhúzva) - 46-50°, a *Hae*III (GGCC) - 40-43°, a *Sin*I (GG<sup>A</sup>/TCC) - 33-36°, a *Sau*96I (GGNCC) - 52-57°, a *Hpa*II (CCGG) - 30°, illetve a *Hha*I (GCGC) metiltranszferáz 13°-os szögben görbítette meg a DNS-t.

3, A *Bsp*RI és a *Hae*III metiltranszferázokkal "phasing" analízist végeztünk annak az érdekében, hogy meghatározzuk vajon az enzim a kis vagy a nagy árok felé görbíti-e a DNS-t. Ehhez négy plazmidot hoztunk létre (pBSuf1, pBSuf11, pBSuf12, pBSuf13), amelyek polilinker szekvenciái az egyedi GGCC felismerőhelytől különböző távolságra egy ismert irányú és mértékű görbületet hordozó DNS szakaszt tartalmaztak. Mindkét metiláznál úgy találtuk, hogy az enzim által kiváltott görbület a DNS kis árka felé irányul.

#### *A kísérletek eredményeiből levonható következtetések*

Az eredményeink azt mutatják, hogy a C5-MTázok között – a szerkezeti hasonlóság ellenére – jelentős különbségek vannak a DNS szubsztráttal való kölcsönhatás tekintetében. Összefüggés látszik a különböző specifitású MTázok specifitása és az enzim által kiváltott DNS hajlítás mértéke között: azok az enzimek, amelyek felismerőhelyében a "target" citozin 3' szomszédja citozin, nagyobb görbületet indukálnak, mint azok, melyeknél ebben a pozícióban guanin van. Ez legjobban a *Hpa*II, és egy vele azonos specifitású, de a másik citozint metiláló C5-MTáz (*M.Msp*I, CCGG, 140°) összehasonlításából látszik. Adataink azt mutatják, hogy a DNS meghajlítása több C5-MTáz szubsztrátfelismerési mechanizmusának lényeges eleme.

Milyen szerepet tölt be a DNS görbítés a metilációs folyamat során? Egy lehetséges válasz erre a kérdésre az, hogy a DNS görbítése a

szekvenciaspecifikus DNS felismerés mellett elősegíti a báziskifordulást (base flipping). A két kristályszerkezeti modellben jól látszik a metilált citozin teljesmértékű, 180°-os kifordulása a kettősspirálból. Molekuláris modellezési vizsgálatok egy kapcsolatot tártak fel a báziskifordulás és a DNS görbítés között. E szerint, a DNS meggörbülése elősegíti a báziskifordulást, ugyanakkor a báziskifordulás után a DNS könnyebben hajlik meg. Ez a gondolat felveti azt az érdekes kérdést, hogy a DNS görbítés a vizsgált C5-citozin metiltranszferázok esetében a báziskifordulásnak oka vagy következménye. Két modell lehetséges. Az egyik szerint a DNS görbítés a primer folyamat, amely aztán elősegíti a metilálandó citozin kifordulását a kettősspirálból. A másik lehetőség, hogy a görbítés a citozin kifordulása után következik be és a görbítés funkciója így a kialakult szerkezet stabilitásának fenntartása. A második modell valószínűbb. Bizonyíték lehet erre egyrészt az egymás fölötti bázisok kapcsolatából számított, B-DNS-re vonatkoztatott energia értékek (stacking energy). A teljes stacking energiaértékek (mind az ugyanazon a szálon lévő, mind a komplementer szálon lévő bázisok között fellépő kölcsönhatásokkal számolva) a citozin bázisra vonatkoztatva NCC környezetben a következők lehetnek: ha N=Adenin: -6,82; N=Citozin: -5,52; N=Guanin: -7,81; N=Timin: -5,75 kcal/mol. Ez a CCG környezetben (*M.HpaII*-re esete) -6,17 kcal/mol. Mivel ezek az értékek nem térnek el nagy mértékben egymástól, a kvantumenergetikai számítások nem magyarázzák miért látunk drasztikus különbséget az *MspI* (140°) és a *HpaII* (30°) metiltranszferázok által kiváltott DNS görbítés között. Az energiaértékek hasonló DNS hajlítási mértéket feltételeznének. A második modellt, tehát a báziskifordulás elsődlegességét támasztja alá az is, hogy a phasing analízis szerint a *HaeIII* és a *BspRI* metiltranszferáz is a kisárok irányába hajlítja a DNS-t. Molekulamodellezési számítások szerint a báziskifordulás a kisárok felé energetikailag sokkal kedvezőtlenebb, mint a nagyárok felé, mivel a kisárki funkciós csoportok torlódásához vezet. Ha a DNS a felismerőkomplexben a kisárok felé hajlik, mint

azt a kísérleteink mutatják, akkor a hajlítás várhatóan inkább akadályozná, mint segítené a báziskifordulást. A DNS görbítés valószínűleg a báziskifordulás után jöhet létre, funkciója pedig a DNS hélix stabilitásának fenntartása a felismerőkomplexben. A legújabb, *HhaI* metiltranszferázzal végzett molekulaenergetikai számítások arra a következtetésre vezettek, hogy a báziskifordulás a DNS nagyárcában történik. Ez némileg új megvilágításba helyezi a korábbi görbítés és báziskifordulás kapcsolatáról alkotott elképzelésünket. Ha a citozin a nagyárok felé fordul ki a kettős spirálból, nincs akadálya annak, hogy a DNS hajlítás megelőzze a báziskifordulást. A báziskifordulás és a DNS görbítés sorrendjének a tisztázása tehát még további kísérletes munkákat igényel. Feltevésünk szerint a megfigyelt DNS konformációváltozás összefügg a citozin bázis DNS-ből való kilendülésével (base flipping). Ezek a különbségek valószínűleg azt jelzik, hogy a metilálendő bázis kilendülése után a DNS szerkezete a felismerőszekvenciától függően különböző módon stabilizálható.

#### *Az M.SssI variánsok előállítása oligonukleotidokhoz és PNA-hoz való kapcsolás céljából*

Olyan M.SssI variánsokat kívántunk létrehozni, melyek alkalmasak lesznek az ODN, vagy PNA molekulákhoz való konjugációra. Az SssI MTáz ODN/PNA kovalens kapcsolásra több módszer is alkalmasnak látszik. A bifunkcionális reagenssel való keresztkötéshez az SssI metiltranszferázt úgy kell módosítani, hogy annak C-vagy N-terminális végén egy cisztein legyen. Az SssI metiltranszferáz működéséhez feltétlenül szükséges cisztein (C141) mellett még egy cisztein van (C368). Célszerűnek látszott ennek más aminosavra való cserélése. A kovalens kapcsolásra a kémiai peptid ligációt is alkalmazhatjuk. A módszer feltétele, hogy a fehérje N-terminális aminosava cisztein legyen. A

variánsok tervezésénél szem előtt kellett tartanunk azt a feltételt, hogy a fehérjéket minél egyszerűbb módszerekkel, homogenitásig tudjuk majd tisztítani. Ennek érdekében olyan konstrukciókat próbáltunk létrehozni, amelyek valamilyen jól tisztítható fúziós fehérjepartnerhez kötöttek

### **A nem fúziós metiltranszferáz variánsok**

Kezdetben a New England Biolabs cégtől kapott, az *SssI* MTázt gént hordozó plazmid, a pCAL7 módosításával próbáltunk meg metiltranszferáz variánsokat elkészíteni.

az elkészített mutánsok pCAL7-alapú plazmidban:

Gly386Cys mutáns

Cys368Ala mutáns

Cys368Ala+Gly386Cys kettős mutáns

### **A pFLAG-MAC plazmid alapú variáns előállítása**

Miután a pCAL7 plazmid-alapú variánsokat nem tudtuk a szükséges mértékben túltermeltetni és a homogenitásig tisztítani, kísérletet tettünk az *M.SssI* fúziós fehérjeként történő előállítására. Erre a célra a Sigma cég által forgalmazott pFLAG-MAC fúziós plazmidot használtuk. Számos próbálkozás után sem sikerült a kívánt plazmid konstrukciót előállítani. Az izolált plazmid DNS-ek annyiban különböztek a tervezett pFLAG-M.*SssI* plazmidtól, hogy egy nukleotid hiányzott azon a helyen, ahol a két fragmentum ligálódott, emiatt a fúzió sem jöhetett létre a FLAG peptid szekvenciával. Az így pFLAG-M.*SssI*Δ1-nek nevezett plazmidok azonban metiláltak voltak és nyers kivonatban jelentős aktivitást mutattak.



## **N-terminális 6xHis affinitásfarokkal ellátott variánsok előállítása**

A pFLAG-MAC vektorral párhuzamosan kipróbáltuk a pETHis fúziós plazmidrendszert is. Létrehoztuk a pET3His-MSssI plazmidot, amely által kódolt SssI metiltranszferáz N-terminálisan 6xHis affinitásfarkat hordoz. Elkészítettünk továbbá egy olyan variánst is (pET3His-MSssI-74), amely a MTáz génben a C368A, G386C mutációkat hordozza.

Sajnos egyik fent említett konstrukció sem volt megfelelő, mert az enzimszint túlságosan alacsony volt ahhoz, hogy az enzimet könnyen hogenitásig tisztítsuk.

## **Cys141Ser katalitikusan inaktív mutáns előállítása pFLAG-alapú plazmidban**

Egy katalitikusan inaktív mutáns létrehozását azért tartottuk fontosnak, mert nem volt világos, hogy a már kész metiláz variánsokat miért nem voltunk képesek megfelelő mértékben túltermeltetni. Azt feltételeztük, hogy ennek oka a nagy metilációs aktivitás volt, amely a sejtek számára egy bizonyos szint után toxikussá vált. Helyspecifikus mutagenézissel létrehoztuk a C141S mutációt. A mutáns enzimet hordozó pFLAG-MSssIC141S plazmid a vártak megfelelően nem volt metilált, tehát a katalitikus cisztein szerinre cserélése inaktiválta az enzimet. Bár SDS-poliakrilamid gélen megjelent a várt méretű enzim, de a szintje nem volt jelentősen nagyobb, mint a vad típusú enzimé. Ugyanakkor gélen azt is megfigyelhettük, hogy a többi fehérje termelődése IPTG hozzáadása után visszaszorult. A jelenség lehetséges magyarázata lehet, hogy az inaktív mutáns metiltranszferáz megtartotta a DNS-hez való affinitását, amely a replikáció gátlásához vezetett.

## A pBAD24 vector alapú FLAG-M.SssI plazmid létrehozása

A pBAD24 plazmid a toxikus fehérjék klónozására egyik leggyakrabban alkalmazott expressziós vektor. A klónozott gén transzkripciójáért az *araBAD* promóter a felelős. A plazmid azért alkalmas toxikus gének klónozására, mert az *araBAD* promóterről induló transzkripció szintje induktor (L-arabinóz) nélkül nagyon alacsony, és ez a szint glükóz hozzáadásával (katabolitrepresszió) tovább csökkenthető.

Két plazmidot hoztunk létre, melyek által kódolt M.SssI változatok a következő N-terminális nyúlvánnyal, illetve mutációval rendelkeznek:

- pBFL-MSssI-2 plazmid - *N-terminális részen*: MVRTVD (*a vektor polilinker szekenciájából adódó aminosavak*) + MDYKDDDD (*FLAG oktapeptid*)
- pBFL-MSssI-74 plazmid - *N-terminális részen*: MVRTVD (*a vektor polilinker szekenciájából adódó aminosavak*) + MDYKDDDD (*FLAG oktapeptid*), C368A, G386C mutációk

Mindkét metiltranszferáz variáns túltermelését és homogenitásig történő tisztítását (Anti-Flag2-agaróz oszlopon) megoldottuk.

## A C-terminális 6xHis fúziós M.SssI variáns létrehozása

Létrehoztunk egy olyan fúziós MTáz variánst is, amely egy C-terminálisan elhelyezkedő 6xHis fúziós nyúlvánnyt hordoz. A (pBAD24 alapú) pBFH-MSssI nevű plazmid a teljes *sssIM* gént tartalmazta a következő további jellemzőkkel: N-terminális FLAG oktapeptid, enterokináz hasítóhely és azt követő cisztein, C-terminális 6xHis-Cys fúzió, Cys368Ala mutáció. Ez a variáns

alkalmas arra, hogy a tiszta enzim enterokinázzal történő hasítása után N-terminális végálló ciszteint hozzunk létre. A fúziós enzim tisztítását a Sigma cég által a FLAG-fúziós fehérjék tisztítására javasolt protokoll szerint sikerült elvégezni.

### **Ser2Cys mutáns előállítása pBFH-MSssI plazmidban**

Ezt a variánst abban a reményben készítettük, hogy az *E.coli* sejtben a fehérjének az N-terminális kezdő formilmetioninja lehasad, így a fehérjénk az aminosavcsere után ciszteinnel fog kezdődni.

Létrehoztunk egy pBH-MSssI-nek nevezett plazmidot, amely a teljes SssI metiltranszferáz gént hordozta és a következő jellemzőkkel rendelkezett: a metiláz C-terminális részén egy 6xHis-Cys fúziós peptidet ültettünk be, a fehérje N-terminális részét pedig úgy módosítottuk, hogy a második pozícióban, a kezdő metionin után, a szerin helyett cisztein következzen. A plazmid működőképes fúziós metiltranszferázt kódolt, amelyet heparin-agaróz és Ni-agaróz affinitás oszlop segítségével tisztítottunk.

A munka során végig problémát jelentett a metiltranszferázok toxicitása. Számos esetben tapasztaltuk, hogy a sejtek fehérjetermelés indukciója után elpusztultak. Úgy véljük, hogy a toxicitásért valószínűleg a metiláz DNS-hez való kötődése a felelős. A sejt saját DNS-e is számos CG felismerőszekvenciát tartalmaz, amelyek mind potenciális célpontok a metiltranszferáz számára. A toxicitás így azzal magyarázható, hogy a megnövekedett enzimmennyiség hatására a metilálható CG helyek telítődnek enzimek molekulákkal, amelyek így fizikai gátat szabnak a sejt számára létfontosságú gének átíródásainak, vagy a replikációnak.

A pBAD24 plazmid alapú konstrukciók sikerének az oka az lehet, hogy ezeknél a plazmidoknál az *araBAD* operon szabályozását igen szigorú módon lehet szabályozni.

## Közlemények, előadások

### *közlemények:*

**Raskó, T.**, Finta, C. and Kiss, A. 2000. DNA bending induced by DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 28: 3083-3091.

Simoncsits A., Tjornhammar, M.L., **Raskó, T.**, Kiss, A. and Pongor S. 2001 Covalent joining of the subunits of a homodimeric type II restriction endonuclease: single-chain *PvuII* endonuclease. *J Mol Biol.* 309: 89-97.

Kiss, A. , Pósfai, Gy., Zsurka, G., **Raskó, T.** and Venetianer, P. 2001. Role of DNA minor groove interactions in substrate recognition by the M.*SinI* and M.*EcoRII* DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 1; 29: 3188-3194.

### *konferenciák*

Kiss, A., Finta, C. and **Raskó, T.** 1998, Budapest. Analysis of the *BspRI* methyltransferase-DNA interaction. Howard Hughes Medical Institute. Meeting of International Research Scholars.

**Raskó, T.**, Finta, Cs. és Kiss, A. 1999, Straub Napok, Szeged. C5-citozin metiltranszferázok által kiváltott DNS görbítés vizsgálata.

**Raskó, T.** Finta, Cs. és Kiss, A. 2000, Sopron. C5-citozin metiltranszferázok által kiváltott DNS görbítés vizsgálata.

Kiss, A., Zsurka, G., Pósfai, Gy., **Raskó, T.**, Venetianer, P. 2001, Sárospatak. DNS kisárki kölcsönhatások szerepe a DNS (citozin-5) metiltranszferázok szubsztrátfelismerésében.

**Tamás Raskó**, Csaba Finta and Antal Kiss. 2001, Szeged. DNA bending induced by DNA (cytosine-5)-methyltransferases. Magyar-Lengyel PhD konferencia.

**Tamás Raskó**, Slaska-Kiss Krystyna és Antal Kiss. 2001, Kréta. 2002, Newcastle. 2003, Verbania. 2003, Berlin. Engineering M.SssI variants for

terminal coupling to oligonucleotides or PNA. Meetings of the FP5 Programme "QUALITY OF LIFE AND MANAGEMENT OF LIVING RESOURCES".